

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

ALGE I FORENZIKA
ALGAE AND FORENSICS
SEMINARSKI RAD

Maja Mihaljević
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)
Mentor: prof. dr. sc. Anđelka Plenković-Moraj

Zagreb 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. DIJATOMEJE I DIJAGNOZA UTAPANJA	3
3. METODE	5
3.1. Uzorkovanje i čuvanje uzoraka	5
3.2. Otapala za pročišćavanje uzoraka	6
3.3. Mikroskopiranje i interpretacija rezultata	7
4. OSTALE METODE I PRIMJENE ALGI	9
4.1. Automatske analize računalnim programima	9
4.2. DNA analize	9
4.3. Infracrvena spektroskopija	10
4.4. Određivanje vremena koje je tijelo nakon smrti provelo u vodi	10
5. LITERATURA	11
6. SAŽETAK	12
7. SUMMARY	12

1. UVOD

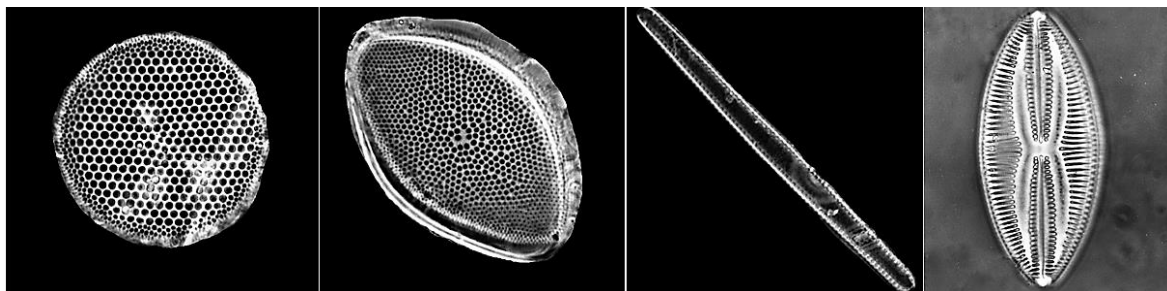
Alge su eukariotski, pretežito vodeni, fotosintetski organizmi. Svojom veličinom mogu varirati između nekoliko mikrometra u promjeru kao što je slučaj kod jednostaničnih algi, pa sve do preko 30 metara dugih kelpova. Stara podjela na carstvo Protista obuhvaća pripadnike filogenetski vrlo udaljenih skupina Eukaryota, heterogena je i polifiletska. Danas se alternativno predlaže podjela Eukaryota na 6 super-grupa: Amebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata i Excavata, a takson Protista više nije službeno priznat. Ipak, popularni pojam „protisti“ koristi se za opisivanje pripadnika Eukaryota jednostanične građe ili višestanične građe bez diferenciranih tkiva. Alge predstavljaju fotosintetske, autotrofne i miksotrofne protiste, a pripadnike algi nalazimo među skupinama Archaeplastida i Chromalveolata (Adl, 2005.). U forenzici se od svih protista najčešće koriste alge, a najpopularnije alge su dijatomeje ili alge kremenjašice (Bacillariophyta) premda se sve više radi i na iskorištavanju ostalih skupina algi u forenzičkim analizama.

Pojam *forenzika* se uobičajeno koristi za opisivanje bilo kakve detaljne analize prošlih događaja, tj. traženja dokaza. Forenzička biologija je široko definirana kao primjena znanosti biologije u pravnim istragama i prema tome pokriva anatomiju i fiziologiju čovjeka te organizme od virusa do kralježnjaka i teme od ubojstva pa sve do krijumčarenja zaštićenih biljnih vrsta (Gunn, 2009.).

Godine 1904. Revenstorf je postigao veliko otkriće pokušajem iskorištavanja dijatomeja za potvrđivanje smrti utapanjem iako ih je još 1896. Hofmann prvi otkrio u tekućini iz pluća (Vij, 2011.). Od tada, znanstvenici su razvili mnogo metoda izolacije algi iz tkiva utopljenika. Danas se alge u forenzici koriste kako bi se potvrdila dijagnoza utapanja, a ponekad i samo mjesto utapanja, a u tu se svrhu upotrebljavaju dijatomeje zbog svoje široke rasprostranjenosti u morskim i slatkovodnim staništima, zemljama i općenito svim vlažnim staništima (Verma, 2013.) i zbog velikog broja opisanih vrsta, njih oko 16000 (Rogers, 2011.). Uz to, dijatomeje imaju staničnu stjenku građenu od silicijevog dioksida (SiO_2) koja ostaje cijela čak i kada je tijelo utopljenika jako raspadnuto i na njemu više nije moguće pronaći ostale znakove utapanja (Kobayashi, 1993.).

Staničnu stjenku nazivamo kremenom kućicom ili frustulom, a nalik je valjku koji se sastoji od dvije preklapajuće polovice nazvane epiteka i hipoteka. One su perforirane kompleksnim i nježnim uzorcima na temelju kojih je zajedno sa samim oblikom kućice moguće odrediti vrstu dijatomeje. Prema obliku kućice i rasporedu perforacija, dijatomeje se dijele na

dva reda, Centrales (Biddulphiales) koje karakterizira radijalna simetrija i raspored ukrasa kućice i Pennales (Bacillariales) karakteristične po bilateralnoj simetriji i ukrasima nalik peru (Rogers, 2011.).

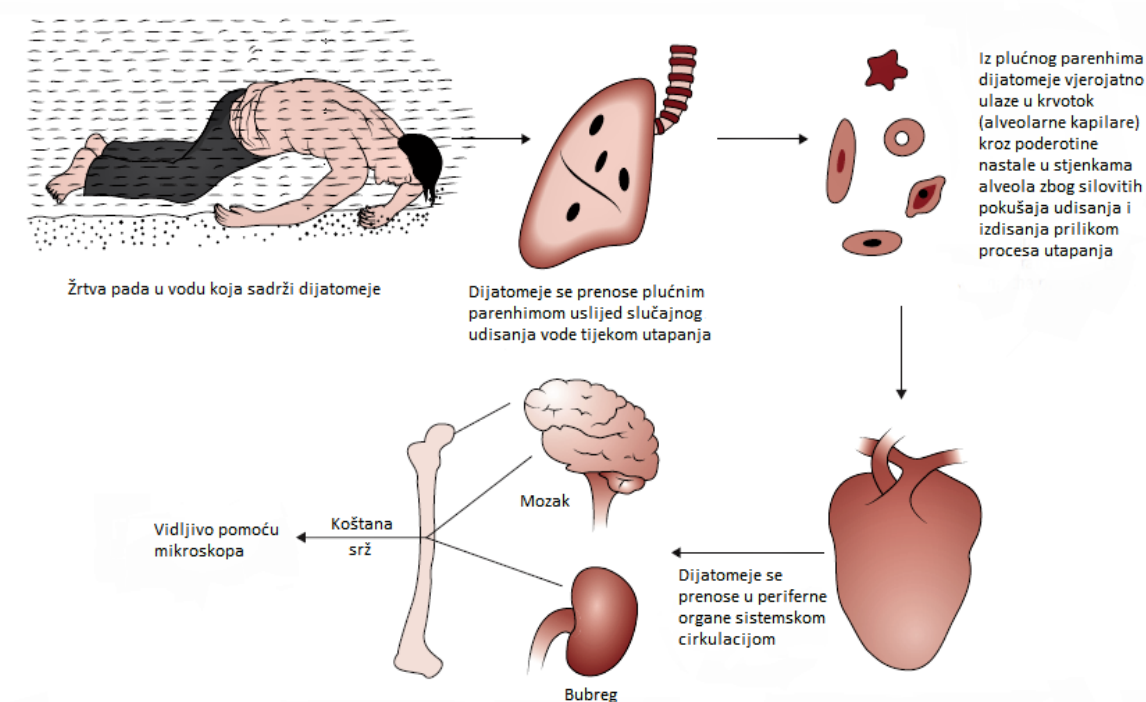


Slika 1. Različiti oblici kućica dijatomeja (Slijeva nadesno: *Thalassiosira* sp., *Hemidiscus* sp., *Thalassionema* sp., *Lyrella* sp.)

(prilagođeno na temelju www.ucl.ac.uk/GeolSci/micropal/diatom.html)

2. DIJATOMEJE I DIJAGNOZA UTAPANJA

Utapanje je rezultat gušenja uslijed uranjanja usta i nosnica u tekućinu iako neki patolozi naglašavaju da uključuje i udisanje tekućine u dišne putove. Teško je postaviti dijagnozu utapanja i znakovi potapanja često ukazuju tek na to da je tijelo bilo pod vodom ili nekom drugom tekućinom kroz neki vremenski period, ali ne i da je žrtva zaista utopljena (Gunn, 2009.). Takozvani dijatomejski test, izolacija silikatnih kućica dijatomeja iz uzorka tkiva nekog organa (pluća, jetre, koštane srži) utopljenika (Sidari, 1999.) može pomoći pri otkrivanju stvarnog uzroka smrti žrtve. Zbog široke rasprostranjenosti dijatomeja u mnogim vodama, njihova prisutnost u plućima i ostalim tkivima koristi se kao indikator da je osoba možda utopljena. Moguće ih je izolirati iz želuca (što ukazuje da je voda možda progutana prilikom utapanja, iako u želudac može ući i pasivno, nakon smrti), iz pluća (što može pokazivati da je osoba udahнула vodu, iako voda i u pluća može ući pasivno (Vij, 2011.)) i koštane srži, krvi i perifernih organa (što znači da je voda udahnuta dok je osoba još bila živa).



Slika 2. Shematski prikaz ulaska dijatomeja u krvotok i taloženja u tkivu perifernih organa (Prilagođeno na temelju Vij, 2011.)

Veličina dijatomeja kreće se između 5 μm i 3 mm, ali generalno samo dijatomeje nešto veće od eritrocita (od 10 μm do 40 μm) mogu ući u arterijski sustav i istaložiti se u perifernim

organima iz kojih ih je moguće izolirati i analizirati kako bi se utvrdilo utapanje (Sidari, 1999.). Ponekad dijatomeje izolirane iz perifernih organa mogu pokazati je li osoba utopljena u morskoj ili slatkoj vodi ili pak u lokvi vode ako su prisutne vrste u uzorku karakteristične baš za takva staništa. Usporedba uzoraka vode iz pluća i tkiva i vode u kojoj je tijelo eventualno pronađeno može pokazati je li osoba utopljena na tom mjestu ili negdje drugdje.

Ipak, negativan dijatomejski test ne mora nužno značiti da osoba nije utopljena, i suprotno, pozitivan dijatomejski test ne znači uvijek da je osoba zaista utopljena. Zbog toga je bitno sve rezultate dijatomejskih testova sagledati u kontekstu ostalih dokaza i informacija poznatih o žrtvi (Ludes, 1999.). Lažno negativni testovi mogu biti rezultat činjenice da u vodi u kojoj je tijelo pronađeno nije bilo prisutnih dijatomeja dovoljno malih da uđu u krvotok utopljenika ili da metoda izolacije dijatomeja iz uzorka organa nije bila prikladna, na primjer, otapalo Soluene-350 otapa kućice morskih, ali ne i slatkovodnih dijatomeja. Dijatomejski testovi također mogu biti lažno pozitivni ako je osoba redovito bila izložena dijatomejama. Na primjer, osoba koja redovito pliva u jezeru, rijeci ili moru, vjerojatno će imati dijatomeje u perifernim organima jer se čak i najboljim plivačima (poput tuljana) ponekad dogodi da udahnu manju količinu vode. Uz to, dijatomeje se često koriste u industriji pa ih ima u filterima, izolacijskim i abrazivnim sredstvima, bojama i lakovima, a čak se koriste i kao baza za izradu dinamita (Rogers, 2011.). Ove lažno pozitivne rezultate dijatomejskog testa je lako isključiti jednostavnom usporedbom vrsta nađenih u vodi s onima izoliranim iz tkiva. Kako se u industriji koriste dijatomeje iz tla bogatih dijatomejama, takvi uzorci sadrže mnoge fosilizirane vrste koje je lako razlikovati od onih iz vode (Ludes, 1999.).

3. METODE

Prije same analize algi, potrebno ih je izolirati iz tkiva tijela i iz vode u kojoj je tijelo nađeno tj. u kojoj se sumnja da je žrtva utopljen. Za prikupljanje uzoraka algi iz vode koriste se metode različite od onih za prikupljanje uzoraka iz tijela, a za pročišćavanje uzoraka postoji nekoliko različitih otapala. Pročišćene uzorke potrebno je promotriti mikroskopom, a potom na temelju morfologije odrediti o kojim se vrstama dijatomeja radi i usporediti vrste iz uzorka vode s onima iz uzorka tkiva.

3.1. Uzorkovanje i čuvanje uzoraka

Dijatomeje i ostale alge mogu se sakupiti iz jezera i mora fitoplanktonskim mrežama s promjerom rupica u tkanju od 0.1 mm do 0.3 mm. U brzim tekućicama moguće je dobiti uzorak struganjem perifitona s kamenja s dna. Ako je dno prekriveno makroalgama, potrebno ih je otresti kako bi se uzorkovale dijatomeje i ostale perifitonske mikroalge. Uzorak je moguće fiksirati u formalinu (Sidari, 1999.). Dovoljno je i uzeti uzorak vode iz mora, jezera, rijeka ili lokvi i odmah ga tretirati kiselinom ili nekim drugim otapalom (Pollanen, 1998.).

Uzorci iz tijela obično se uzimaju iz bedrene kosti, jetre, bubrega i/ili pluća jer je kontaminacija ovih tkiva vanjskim dijatomejama malo vjerojatna. Bedrenu kost je potrebno očistiti kuhanjem u destiliranoj vodi kako bi se izbjegla kontaminacija uzorka, a zatim prepiliti longitudinalno i sastrugati koštanu srž. Za ostale organe je dovoljno izrezati komadić tkiva. Koštanu srž i tkiva ostalih organa je zatim potrebno homogenizirati i tretirati kiselinom ili drugim otapalom.

Ponekad vrste dijatomeja iz tijela ili njihovi udijeli ne odgovaraju onima iz vode. Treba uzeti u obzir da se udijeli algi u vodi mijenjaju sezonski i u ovisnosti o dubini i da je možda potrebno napraviti analizu uzoraka vode na različitim dubinama i vremenima kroz godinu. Ipak, jedan uzorak vode dovoljan je za usporedne analize u 90% slučajeva (Pollanen, 1998.).

Prilikom prikupljanja uzoraka, bilo na terenu ili u laboratoriju valja imati na umu da su dijatomeje vrlo široko rasprostranjene i prema tome je potrebno posebnu pozornost posvetiti prevenciji kontaminacije uzoraka u svakom trenutku.

3.2. Otapala za pročišćavanje uzorka

U uzorcima se mogu naći i ostali mikroorganizmi, tkivo, zemlja i pijesak pa je dijatomeje potrebno izdvojiti. U tu se svrhu najčešće koriste dušična kiselina (HNO_3), sumporna kiselina (H_2SO_4), Soluene-350 i proteinaza K. Prilikom izbora otapala bitno je imati na umu da određena otapala daju bolje ili lošije rezultate, ovisno o vrstama algi koje se mogu naći u uzorku. Svako od ovih metoda slijedi centrifuga ili taloženje i odvajanje supernatanta, ispiranje i promatranje pod mikroskopom.

Metoda razgradnje tkiva i ostalih nečistoća u uzorku dušičnom kiselinom najčešće je korištena. Premda daje pouzdane rezultate, traje 48 sati, kiselinu je potrebno zagrijavati što povećava opasnost od udisanja kiselinske pare prilikom rukovanja, a sama reakcija razgradnje tkiva burnija je od reakcije sumporne kiseline i ostalih otapala.

Metoda razgradnje sumpornom kiselinom traje 24 sata što je kraće od prethodne metode, a uz to, reakcija nije toliko burna. Kao i dušičnu kiselinu, potrebno ju je zagrijavati što povećava opasnost izvođenja ove metode, a uz to treba paziti da u uzorku tretiranom sumpornom kiselinom nema kalcijevog karbonata (CaCO_3) jer se inače u preparatu talože kristali gipsa i onemogućuju promatranje algi pod mikroskopom.

Soluene-350, organska baza dobivena od toluena, aromatskog ugljikovodika, također se koristi za razgradnju tkiva. Reakcija traje oko 12 sati, a zagrijavanje i ultrazvuk ubrzavaju razgradnju, bez da uništavaju kućice dijatomeja (Matsumoto, 1993.). Nedostatak je što Soluene-350 dokazano razgrađuje morske dijatomeje pa je ovu metodu u slučajevima utapanja u morskoj vodi potrebno zamijeniti nekom drugom poput proteinaze K (Sidari, 1999.). Prema tome, ako dijatomejski test ovim otapalom daje negativne rezultate ne možemo zaključiti da osoba nije utopljena, već da vjerojatno nije utopljena u slatkoj vodi.

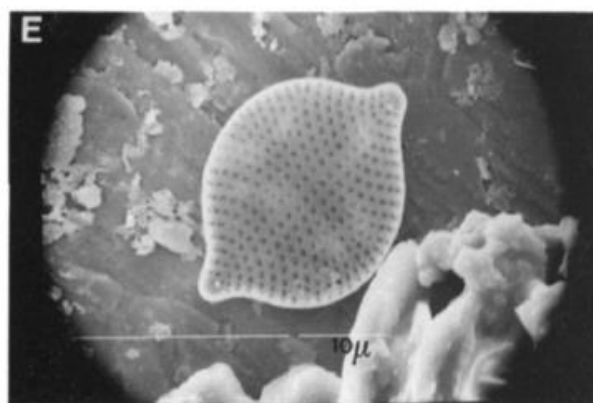
Razgradnja proteinazom K s natrijevim dodecil sulfatom (SDS) je metoda blaža od prethodno navedenih. Osmišljena je prvenstveno zbog toga što ostala otapala razgrađuju sve osim silikatnih kućica dijatomeja premda i udio nerazgrađenih kućica ovisi o vrsti dijatomeja i otapala korištenih za pročišćavanje. Primjenom ove metode u uzorku uz dijatomeje ostaju i neke praživotinje (Protozoa) i zelene alge (Chlorophyta) koje imaju celulozne stanične stijenke, lorike, koje je ponekad moguće determinirati na temelju morfologije. (Kobayashi, 1993.)

3.3. Mikroskopiranje i interpretacija rezultata

Preparate nakon pročišćavanja je potrebno analizirati pod mikroskopom kako bi se determinirale vrste dijatomeja i eventualno ostalih algi na temelju morfologije. Najdetaljnije slike daju elektronski mikroskopi. Transmisijski elektronski mikroskop (TEM) bolji je za promatranje finijih, nježnih kućica od tankog sloja silicijevog dioksida dok je skenirajući elektronski mikroskop (SEM) bolji za promatranje kućica u cjelini (Verma, 2013.). Osim elektronskih mikroskopa mogu se koristiti i fazno-kontrastni mikroskop (Pollanen, 1998.) i svjetlosni mikroskop s imerzijskim objektivom (Ludes, 1999.).



Slika 3. Dijatomeje promatrane svjetlosnim mikroskopom (Gunn, 2009.)



Slika 4. Dijatomeja promatrana skenirajućim elektronskim mikroskopom (Pachar, 1993.)

Rezultat dijatomejskog testa se može smatrati pozitivnim ako uzorak sadrži 20 dijatomeja po 100 μ L sedimenta dobivenog razgradnjom 10g tkiva pluća i 5 cjelovitih dijatomeja za jednaku količinu tkiva ostalih organa. Ovakvi brojčani kriteriji definirani su kako bi se izbjegla mogućnost lažno pozitivnih testova uslijed kontaminacije uzorka (Ludes, 1999.).

Samo 28% utapanja u slatkoj vodi i tek 10% utapanja u kadi daje pozitivan dijatomejski test koštane srži, a ipak se on izvodi rutinski u primjerenim situacijama jer može biti iznimno bitan u određivanju uzroka smrti (Pollanen, 1998.). Ovako nizak udio pozitivnih testova rezultat je nekoliko faktora. Kao prvo, ovaj test nije dovoljno osjetljiv i ako se u dobivenom uzorku nalazi samo jedna do dvije jedinice dijatomeje, lako je previdjeti ih i zaključiti da je rezultat negativan. Kao drugo, plućne i srčane mane ili mane cirkulacijskog sustava utopljenika mogu

utjecati na volumen tekućine koja uđe u cirkulacijski sustav. Također je moguće u rijetkim slučajevima da samo neznatni volumen vode uđe u pluća ako je osoba bila u nesvijesti ili ako se dogodi kontrakcija glasnica prilikom utapanja. To je takozvano suho utapanje i dijatomeje teško da će prodrijeti u organe i koštanu srž osoba utopljenih na takav način (Vij, 2011.). Na kraju, relativno mali volumen krvi kola koštanom srži pa se zbog toga često potrebno osloniti i na testove ostalih organa i komparativne analize s uzorcima vode (Verma, 2013.).

4. OSTALE METODE I PRIMJENE ALGI

Vrste dijatomeja i ostalih algi se obično određuju na temelju morfologije, ali takav pristup oduzima puno vremena i često nije potpuno pouzdan. Zbog toga se razvija nekoliko alternativnih pristupa.

4.1. Automatske analize računalnim programima

U posljednje vrijeme radi se na razvijanju računalnih programa koji bi na temelju morfoloških obilježja kućica automatski određivali vrste dijatomeja i pritom ih brojali. Trenutni programi analiziraju konture stanica sa digitalnih fotografija i sami ih prerađuju u krivulje i uspoređuju s unaprijed zadanim parametrima. Krajnji cilj je analiziranje obrisa dijatomeja zajedno s prednjom i stražnjom stranom teka kućica i svim perforacijama na njima. Zasad automatizirane analize dosežu preko 80% točnosti što se lako može mjeriti s rezultatima ljudskih eksperata (Jalba, 2005.). Problem je to što su razna istraživanja već dokazala da postoji puno „prikrivenih“ vrsta i „lažnih“ vrsta koje nije moguće razlučiti samo na temelju morfoloških obilježja.

4.2. DNA analize

DNA analize dijatomeja i ostalih algi sastoje se od amplifikacije DNA fragmenata gena vezanih uz klorofil i elektroforeze u poliakrilamidnom gelu. Ne samo da nisu podložne subjektivnosti osobe koja određuje vrste na temelju morfologije, nego omogućuju analizu ostalog fitoplanktona, pa čak i zooplanktona s klorofil-vezanim genima jer su otapala koja se koriste blaža od kiselinskih. Usput se izbjegavaju klasične metode razgradnje kiselinama koje mogu biti opasne ili uzrokovati zagađenje zraka. U radu Abea iz 2003., DNA fragmenti amplificirani su PCR-om (lančanom reakcijom polimeraze), a korištene početnice dizajnirane su za gene podjedinice ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaze/oksigenaze kloroplasta vrsta *Euglena gracilis* i *Skeletonema costatum* prisutnih u slatkim vodama i moru. Dokazano je da se te početnice mogu koristiti za dobivanje DNA nekih algi i ostalog planktona, ali ne i čovjeka ili nekih biljaka poput špinata i peršina. Nedostatak PCR analiza je potreba za dizajniranjem početnica specifičnih za određene vrste koje zauzvrat ne garantiraju da će biti amplificirani fragmenti svih vrsta planktona prisutnog u uzorku. Zbog toga DNA analizama zasad nije

moguće potvrditi mjesto utapanja (Pollanen, 1998.). Ipak, to je korak naprijed u razvoju pouzdane molekularno-biološke metode za dijagnozu utapanja.

4.3. Infracrvena spektroskopija

Fourier-transform infracrvena spektroskopija (FT-IR) može se koristiti za identifikaciju vrsta algi. Princip rada ove spektroskopije je relativno jednostavan i temelji se na dobivanju spektra infracrveno-aktivnih biokemijskih komponenata stanice. Spektar varira od vrste do vrste zbog različitih kombinacija i koncentracija pojedinih komponenata što se može iskoristiti za razdvajanje uzoraka (Vardy, 2002.). Iako je dokazano sposobna razlikovati vrste koje je gotovo nemoguće razlučiti na temelju morfologije, ova metoda nije široko primijenjena za identifikaciju dijatomeja u forenzičkim istragama (Gunn, 2009.).

4.4. Određivanje vremena koje je tijelo nakon smrti provelo u vodi

Stopa kolonizacije algi na potopljenim leševima je potencijalno iskoristiva kako bi se došlo do podatka o vremenu koje je leš proveo u vodi, ali zasad nema mnogo provedenih istraživanja koja se bave ovom temom. Umjesto određivanja i brojanja pojedinih vrsta algi, njihovu relativnu gustoću je moguće dobiti mjerenjem koncentracije klorofila a u prikupljenim uzorcima. Nedostatak je što ovim analizama moraju prethoditi dugotrajna i detaljna istraživanja populacija algi u određenom vodenom ekosustavu kako bi se došlo do referentnih vrijednosti koncentracija klorofila a. Uz to, stope rasta algi ovise o mnoštvu faktora poput dubine, supstrata, lokalnim vremenskim uvjetima i godišnjem dobu koje treba uzeti u obzir pri interpretaciji rezultata. Na primjer, stopa rasta će biti veća ljeti u jezeru bogatom hranjivim tvarima nego zimi, u hladnom planinskom potoku siromašnom hranjivim tvarima (Gunn, 2009.). U budućnosti, ovakva metoda primjene algi u forenzici možda će postati rutinska.

5. LITERATURA

1. Abe, S. *et al.* (2003.), A Novel PCR Method for Identifying Plankton in Cases of Death by Drowning, *Med. Sci. Law*, 43:23-30
2. Adl., S. M. *et al.* (2005.), The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists, *J. Eukaryot. Microbiol.*, 52:399-451
3. Gunn, A. (2009.), *Essential Forensic Biology*, Wiley-Blackwell, Liverpool, p315-p319
4. Jalba, A. C. *et al.* (2005.), Automatic diatom identification using contour analysis by morphological curvature scale spaces, *Machine Vision and Applications*, 16:217-228
5. Kobayashi, M. *et al.* (1993.), Novel detection of plankton from lung tissue by enzymatic digestion method, *Forensic Science International*, 60:81-90
6. Ludes, B. *et al.* (1999.), Diatom analysis in victim's tissues as an indicator of the site of drowning, *Int J Legal Med*, 112:163-166
7. Matsumoto, H. *et al.* (1993.), A simple method for diatom detection in drowning, *Forensic Science International*, 60:91-95
8. Pachar, J. V. *et al.* (1993.), The Diagnosis of Drowning by Quantitative and Qualitative Diatom Analysis, *Med. Sci. Law*, 33:291-299
9. Pollanen, S. (1998.), Diatoms and homicide, *Forensic Science International*, 91:29-34
10. Rogers, K. (2011.), *Fungi, Algae and Protists*, Britannica Educational Publishing., p89-p90, p106, p185-p186
11. Sidari, L. *et al.* (1999.), Diatom test with Soluene-350 to diagnose drowning in sea water, *Forensic Science International*, 103:61-65
12. Vardy, S. *et al.* (2002.), Fourier Transform Infrared Microspectroscopy as a Tool to Differentiate *Nitzschia closterium* and *Nitzschia longissima*, *Applied Spectroscopy*, 56:1545-1548
13. Verma, K. (2013.), Role of Diatoms in the World of Forensic Science, *Forensic Research*, 4:181
14. Vij, K. (2011.), *Textbook of Forensic Medicine and Toxicology*, Elsevier, India, p137-p138
15. www.ucl.ac.uk/GeolSci/micropal/diatom.html

6. SAŽETAK

Alge, premda globalno rasprostranjene u vodenim i vlažnim staništima, trenutno su slabo primijenjene na području forenzike. U ovom radu izloženi su načini primjene algi za utvrđivanje smrti utapanjem. Ovakav način smrti je autopsijom teško utvrditi sa sigurnošću, ali ponekad alge, s naglaskom na dijatomeje kao najčešće korištene, mogu pomoći otkloniti sumnju. Uz trenutno korištene metode, u ovom radu su ukratko predstavljeni i novi načini iskorištavanja algi koji će u budućnosti dodatno olakšati utvrđivanje dijagnoze utapanja, mjesta utapanja, pa čak i vremena smrti.

7. SUMMMARY

Algae are currently being poorly exploited in the field of forensics albeit being globally distributed across water habitats and moist habitats. Different uses of algae for the diagnosis of drowning are reviewed in this work. Diagnosis of death by drowning at autopsy is difficult, but sometimes algae, with diatoms as the most commonly used, can help remove any suspicion. Along with currently used methods, reviewed in this work are new means of using algae which will additionally make the diagnosis of drowning as well as establishing the place of drowning and even time of death easier in the future.

